钝齿棒杆菌中异源表达 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶合成 L-鸟氨酸的研究

舒群峰[1] 徐美娟[1**] 李静[1] 张显[1] 杨套伟[1] 许正宏[1] 饶志明[1**]

1 江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室， 江苏 无锡 214122

摘要： 目的：对一株产鸟氨酸的钝齿棒杆菌 *Corynebacterium crenatum* SYPA5-5/*ΔproB*/*ΔargF* (SYPO-1) 进行代谢工程改造，筛选不同细菌来源的 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶在大肠杆菌中克隆与表达，纯化后对其进行酶学性质的比较；将粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* Y213 来源的 *Smarg*E 基因编码的 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶在 L-鸟氨酸生产菌株 *C. crenatum* SYPO-1 中过量表达，进一步提高 L-鸟氨酸的产量。方法：通过利用 pDXW10 穿梭质粒对不同来源的 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰化酶进行克隆表达和酶学性质比较，选择性质最优来源的 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶编码基因 *Smarg*E 在产 L-鸟氨酸重组钝齿棒杆菌中表达，考察重组菌株发酵过程中参数的变化。结果：来源 *S. marcescens* Y213 的 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶比酶活最高为 798.98 U/mg，最适 pH 为 7，最适温度为 37 ℃，0.1 mM 的 Mg^{2+}, Li^{+}, Mn^{2+} 金属离子促进酶的比酶活提高了 50%；在钝齿棒杆菌中表达 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶酶活达到 128.4 U/mL，显著提高了钝齿棒杆菌中胞内乙酰基循环水平；5-L 发酵罐发酵重组菌株 96 h，L-鸟氨酸的产量达到 38.5 g/L，比出发菌株，N-中 L-鸟氨酸的产量提高了 33.2%，产率达 0.401 g/L/h。结论：筛选出最佳来源的 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶，在鸟氨酸生产菌株 *C. crenatum* (SYPO-1)中过量表达，可以促进鸟氨酸的前体物质 N-乙酰鸟氨酸的快速消耗，实现鸟氨酸的积累。

关键词： L-鸟氨酸；钝齿棒杆菌；N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶；*argE*

Producing L-Ornithine by Heterologous Expression of N-acetyl-L-ornithine deacetylase in *Corynebacterium crenatum*

SHU Qun-feng[1] XU Mei-juan[1**] LI Jing[1] ZHANG Xian[1] YANG Tao-wei[1] XU Zheng-hong[1] RAO Zhi-ming[1**]

1The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122,

---

＊ 国家自然科学基金(31770058)，江苏省杰出青年科学基金 (BK20150002)，教育部重点研究项目（113033A），中央高校基本科研业务费专项资金资助(JUSRP51708A)和江苏高校优势学科建设工程资助项目资助。

**通讯作者，电子邮箱 xumeijuan@jiangnan.edu.cn； raozhm@jiangnan.edu.cn

Jiangsu, People's Republic of China

Abstract Objective: The metabolic pathway engineering of *Corynebacterium crenatum* SYPA5-5/*ΔproB*/*ΔargF* (SYPO-1) has been performed to further enhance the pathway flux of L-ornithine biosynthesis. Firstly, the four genes encoding N-acetyl-L-ornithine deacetylase (NAOD) from different bacterial sources were screened, cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Then the recombinant NAODs were purified and characterized. The *argE* gene from *Serratia marcescens* Y213 was overexpressed in the L-ornithine producing strain *C. crenatum* SYPO-1 to increase the L-ornithine production. Methods: The genes from different sources were sub-cloned into the pDXW10 plasmid and expressed under the tacM promoter in *E. coli* BL21(DE3). Then the recombinant N-acetyl-L-ornithine deacetylation were purified and their characterization were studied. The optimal N-acetyl-L-ornithine deacetylase was expressed in recombinant *C. crenatum*. The parameters of the recombinant strains during fermentation were also investigated. Results: The recombinant *argE* coding NAOD enzyme from *S. marcescens* showed a very higher activity than the other NAOD enzymes from *E. coli* BL21(DE3), *K. pneumoniae* and *B. subtilis*, the activity was 798.98 U / mg, the optimum pH and temperature were 7 and 37 ℃ respectively. SmNAOD was expressed in *C. crenatum*, and the activity was 128.4 U/mL, which was significantly increasing intracellular acetyl cycle levels. At the end of fermentation, L-ornithine yield increased to 38.5 g/L with the overall productivity of 0.401 g/L/h in the recombinant SYPO-2, which was approximately 21.3 and 33.2% higher than that of SYPO-1 and SYPO-3, respectively. Conclusion: The N-acetyl-L-ornithine deacetylase from *S. marcescens* Y213 has been screened and overexpressed in the L-ornithine producing strain *C. crenatum* SYPO-1, which could promote the rapid consumption of L-ornithine precursors and achieve L-ornithine accumulation. This study demonstrates a huge potential of *C. crenatum* to overproduce not only L-ornithine but also L-citrulline, L-arginine from renewable resources such as glucose.

Keywords: L-Ornithine; *Corynebacterium crenatum;* N-acetyl-L-ornithine deacetylase; *arg*E

L-鸟氨酸是一种重要的食物添加剂，常常运用于食品、医药及化工领域中，已经被人所知的在治疗肝脏疾病及伤口的愈合有重要价值[1]。微生物法生产鸟氨

酸相对与化学合成具有低耗能，环保，易分离提取的优势，更具有工业化生产的应用价值[2]。

L-鸟氨酸是 L-精氨酸合成的中间代谢产物，其合成途径包括以 *Escherichia coli* 为代表菌属的乙酰基线性化途径[3]和以 *Corynebacterium glutamicum* 为代表的乙酰基的循环途径[4]。其中，谷氨酸棒杆菌不仅是 L-谷氨酸、L-赖氨酸、L-精氨酸的生产菌，也是生产 L-鸟氨酸的优势菌种[5]。在谷氨酸棒杆菌中由前体 L-谷氨酸合成 L-鸟氨酸需要四步反应，由位于同一基因簇上的 *arg*CJBD 四个基因编码的酶来催化的。其中由 *arg*J 编码的 L-鸟氨酸合成关键酶 N-乙酰鸟氨酸乙酰基转移酶 (L-ornithine acetyltransferase; OATase; EC 2.3.1.35) 为双功能酶，它催化 N-乙酰鸟氨酸和 L-谷氨酸合成 L-鸟氨酸和 N-乙酰谷氨酸，实现了乙酰基的循环利用，但此酶受到 L-鸟氨酸的反馈抑制[6]。课题组前期在高产 L-精氨酸菌株钝齿棒杆菌 (*Corynebacterium crenatum* SYPA5-5) 中过量表达 *arg*J 基因，可提高 L-精氨酸的产量[6]。而在大肠杆菌中，鸟氨酸的生成主要是由 *arg*ABCDE 这几个基因来控制的。大肠杆菌中鸟氨酸的合成途径为线性途径，由于 OATase 双功能酶的不存在，由 *argA* 和 *arg*E 编码的 N-乙酰谷氨酸合成酶 (N-Acetylgultamate synthase; NAGS, EC 2. 3. 1. 1)和 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶 (N-acetyl-L-ornithine deacetylase; NAOD, EC 3.5.1.16) 分别实现合成鸟氨酸途径中加乙酰基，去乙酰基的过程。目前，国内外课题组主要通过代谢工程改造谷氨酸棒杆菌来提高 L-鸟氨酸的产量，如 Hwang 报道通过敲除谷氨酸棒杆菌中 *arg*F, *arg*R, *pro*B 基因并且使磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase; PEPCK; EC 4.1.1.32) 失活来提高 L-谷氨酸的利用率，使 L-鸟氨酸的产量到达 179.14 mg/L[7]; 2015 年，韩国团队 Kim 等在已有的产 L-鸟氨酸突变株中过表达 *arg*CBJD 基因簇，优化 NADPH 的含量，利用补料分批发酵技术，发酵 72 h 后鸟氨酸产量到达 51.5 g/L[8]。随后，zhang 等在谷氨酸棒杆菌 S9114 中，过表达 *lys*E 基因对 L-鸟氨酸的产量有促进作用，结合敲除 *arg*F, *ncgl1221*, *arg*R, *put*P 及弱化丙酮酸脱氢酶的活性，通过发酵鸟氨酸产量到达 18.4 g/L[9]。

本实验室拥有一株高产精氨酸的工业用钝齿棒杆菌 *Corynebacterium crenatum* SYPA5-5，未改造前在最优化的培养基中 L-精氨酸产量达 36.1 g/L[10]。课题组经过十余年的努力通过一系列代谢工程改造，显著提高了 L-精氨酸的产量。另一方面，课题组通过同源整合在基因组上敲除 *pro*B 和 *arg*F 基因，获得了

重组钝齿棒杆菌中L-鸟氨酸的过量积累，该菌株被命名为SYPO-1[11, 12]。。本研究克隆表达了来自于 *E. coli* BL21, *Serratia marcescens* Y213, *Klebsiella pneumoniae* P01 和 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str.* 168 中的N-乙酰鸟氨酸脱乙酰化酶（NAOD）编码基因 *arg*E，利用镍柱亲和层析对表达有活性的四种来源的重组NAOD进行纯化，对酶学性质进行初步的研究，选取最佳酶活的来源 *SmargE*；同时构建了重组菌 SYPO-1/pDXW10-*SmargE* (命名为 SYPO-2) 和 SYPO-1/pDXW10-*arg*J (命名为 SYPO-3)。在 *C. crenatum* 中分别加强N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶和N-乙酰鸟氨酸乙酰基转移酶的表达，对重组钝齿棒杆菌进行了酶活分析和发酵产鸟氨酸测定，进一步提高钝齿棒杆菌L-鸟氨酸的产量。

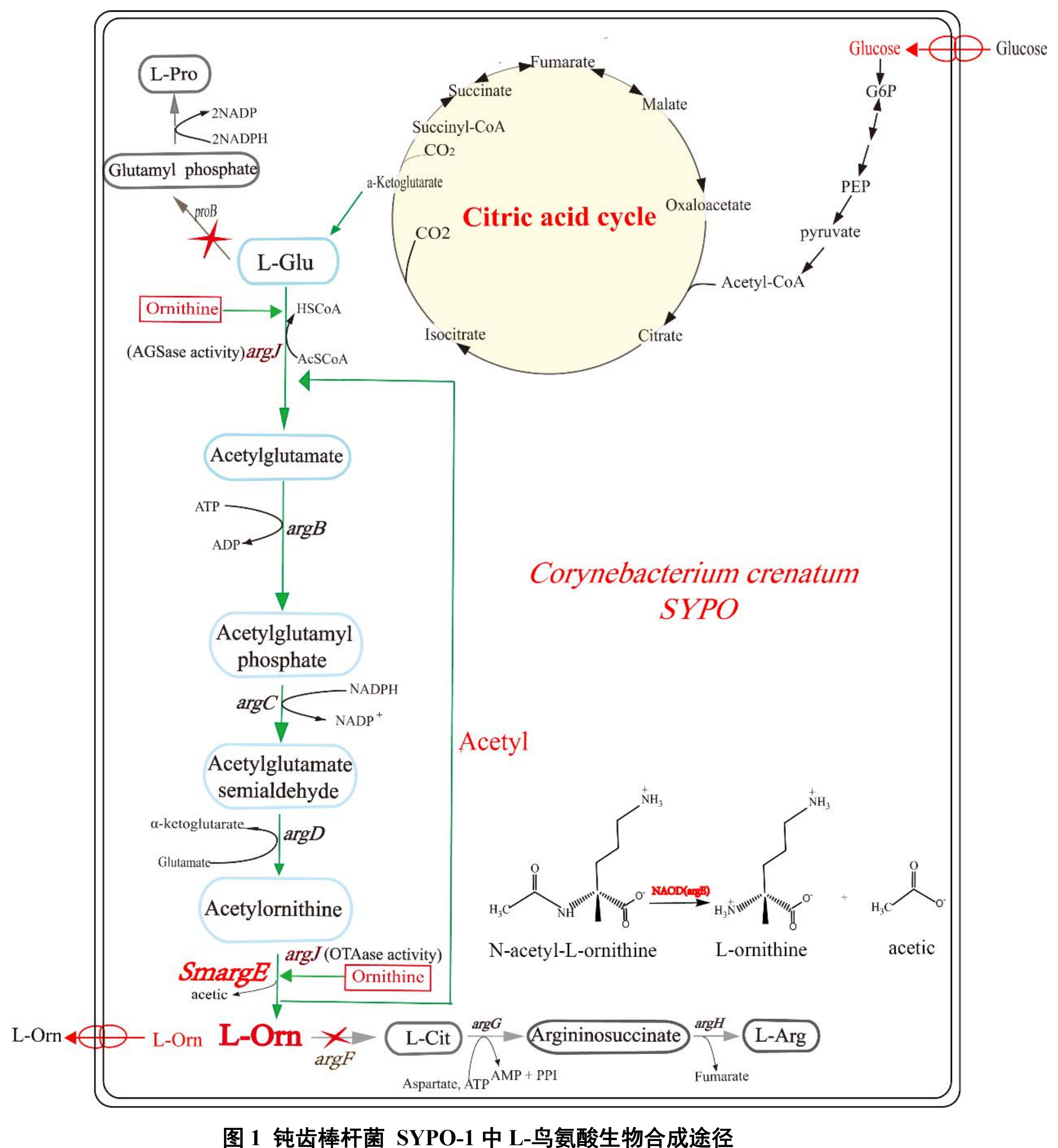


图 1 钝齿棒杆菌 SYPO-1 中 L-鸟氨酸生物合成途径

Fig 1 The L-ornithine biosynthesis pathway in *Corynebacterium crenatum* SYPO-1

表 1 本实验所用的菌株及质粒
Table1 strains and plasmid used in this study

Strain/plasmid	Characteristic	Source
Strains		
E. coli JOM109	*recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, Δ(lac-proAB), [F'traD36, proAB+, lac Iq, lacZ ΔM15]*	Invitrogen
E. coli BL21(DE3)	F⁻ ompT gal dcm lon hsdSB (rB⁻ mB⁻)λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Invitrogen
C.crenatum SYPA5-5	A hyper arginine production strain, His⁻, SG^r, D-Arg^r, H-Arg^r	Our lab
SYPO-1	*C.crenatum SYPA5-5* with *proB and argF* deletion, the positive mutation E19Y of CcNAGK into the chromosome of SYPA5-5	Our lab
SYPO-2	SYPO-1 with pDXW10-*SmargE*	This study
SYPO-3	SYPO-1 with pDXW10-*CcargJ*	This study
Plasmids		
pMD-18T	*E. coli* clone plasmid Amp^r, Col E origin	TaKaRa
T-*CcargJ*	*A derivative of pMD18-T, Amp^r, harboring argJ gene* from *C. crenatum SYPA5-5*	This study
T-*arg*E	*A derivative of pMD18-T, Amp^r, harboring argE gene*	This study
pDXW10	A shutter expression vector, Km^R, P*tac* promoter	[17]
pDXW10-*CcargJ*	A derivative of pDXW10, harboring *argJ* gene from *C. crenatum SYPA5-5* under its native promoter	This study
pDXW10-*EcargE*	A derivative of pDXW10, harboring *argE* gene from *E. coli* BL21(DE3) under its native promoter	This study
pDXW10-*KpargE*	A derivative of pDXW10, harboring *argE* gene from *Klebsiella pneumoniae* P01 under its native promoter	This study
pDXW10-*BsargE*	A derivative of pDXW10, harboring *argE* gene from *Bacillus subtilis subsp. subtilis strain* 168G under its native promoter	This study
pDXW10-*SmargE*	A derivative of pDXW10, harboring *argE* gene from *Serratia marcescens* Y213 under its native promoter	This study

Km^R indicates resistance to kanamycin

1. 材料与方法

1.1 菌株与质粒

C. crenatum SYPA5-5 为本实验室保藏[13, 14]；SYPO-1 为本实验室保藏[11, 12]及 *Serratia marcescens* Y213, *Klebsiella pneumoniae* P01 为本实验室筛选[15, 16]和 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str.* 168 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心；pDXW10 穿梭质粒为王小元教授实验室馈赠[17]；pMD18-T simple vecter 购自大连生物工程有限公司；*Escherichia coli* JM109 和 BL21(DE3) 购自上海生物工程有限公司；重组质粒 pMD18-T-*arg*J; pDXW10-*arg*J, pMD18-T-*arg*E; pDXW10-*arg*E 均由本实验室构建。本实验室使用的菌株，质粒和引物见表 1/2。

1.2 工具酶与试剂

质粒 DNA 小量试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、细菌 DNA 基因组提取试剂盒均购自上海生物工程有限公司；rtaq DNA 聚合酶，Extaq DNA 聚合酶、PrimerStar DNA 聚合酶、T4 DNAligase、*Sal* I、*Sac* I、*Eco*R I 限制性内切酶购自宝公司；N-乙酰鸟氨酸购自 sigma（中国），氨苄霉素、卡那霉素及 L-鸟氨酸，L-精氨酸等购自阿拉丁生物试剂公司；其他试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 培养基及培养方法

大肠杆菌在 LB 培养基中培养，钝齿棒杆菌在 BHIS 培养基中活化，钝齿棒杆菌种子培养基及发酵培养基的制备根据已有的几种精氨酸的培养基进行的改进，种子培养基每升：50 g 葡萄糖，20 g 酵母抽提物，15 g 玉米浆，15 g $(NH_4)_2SO_4$, 2.5g $MgSO_4·7H_2O$, 1g KH_2PO_4, 0.5g K_2HPO_4, 0.5 g Na_2HPO_4，0.05g 精氨酸和 20 g $CaCO_3$。发酵培养基每升培养基包含：100 g 葡萄糖，20 g 玉米浆，50 g $(NH_4)_2SO_4$, 2.5 g $MgSO_4·7H_2O$, 1 g KH_2PO_4, 0.5 g K_2HPO_4, 0.5 g Na_2HPO_4，0.02 g $MnSO_4·4H_2O$, 0.02 g $FeSO_4·7H_2O$, 0.05 g 精氨酸和 20 g $CaCO_3$。初始 pH 调到 7.0。

钝齿棒杆菌的发酵培养方法为：菌种以 5%（体积比）的接种量接种于摇瓶发酵培养基中，将上述的接种后的培养基放置于 30 ^oC、180 r/min 的往复式摇床培养 96 h。5-L 发酵方法参照文献[18]，发酵过程中，每隔 8 h 取 500 mL 样品检测相关指标。

1.4 不同来源的 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶的筛选及酶学性质的研究

经 NCBI 基因组信息数据库和 BRENDA 酶数据库分析，结合本实验室已有的菌株，选择克隆来源于 *Escherichia coli* BL21, *Serratia marcescens* Y213, *Klebsiella pneumoniae* P01 和 *Bacillus subtilis subsp. subtilis str.* 168 中 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶的编码基因，利用大肠杆菌与谷氨酸棒杆菌中的穿梭表达的质粒 pDXW-10[17] 进行克隆与表达，通过 SDS-PAGE (12% 丙烯酰胺) 来验证蛋白大小[19]，通过 His-Trap HP 纯化柱[20]纯化目的蛋白。利用 Bradford 溶液以牛血清蛋白为内参来测定目标蛋白的溶度[21]。参照文献测定 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶的酶活[22]。测定酶的酶学性质参照文献[18]包括比酶活、最适温度、热稳定性、最适 pH、pH 稳定性、金属离子的影响。

1.5 N-乙酰鸟氨酸乙酰基转移酶的酶活测定

参照以前研究报道的方法测定 N-乙酰鸟氨酸乙酰基转移酶的酶活[23]。

1.6 重组钝齿棒杆菌的构建

通过上述的比较，将最优化的来源的重组质粒，利用电转化入 SYPO-1 感受态中[24]。挑取转化子，利用引物 P4 F/R ; P5 F/R PCR 验证，获得重组钝齿棒杆菌株 SYPO-1/pDXW10-*SmargE* 命名为 SYPO-2，及 SYPO-1/pDXW10-*Ccarg*J 命名为 SYPO-3 的阳性转化子。

1.7 发酵参数的鉴定

1.7.1 **菌体生物量的测定：**吸取一定量的发酵液，用 0.125mol/L HCl 去除发酵液中的 $CaCO_3$，利用紫外分光光度测量仪 (UNICOTM-UV2000, 上海, 中国) 在吸光度 562 nm 下检测细胞的 OD 值，菌体干重与细菌的 OD 值的关系为 $1OD_{562}=0.375\ g_{(DCW)}/L$[25]。

1.7.2 **葡萄糖含量的测定：**发酵液离心后取上清，利用生物分析仪 SBA-40C (山东省科学院生物研究所) 测定葡萄糖的含量。

1.7.3 **游离氨基酸的测定：**将发酵液离心取上清稀释一定倍数，以 OPA（邻苯二甲醛）作为衍生化试剂进行氨基酸在线衍生，利用高效液相色谱法 (HPLC) on Agilent 1260 LC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) 进行氨基酸含量的测定[13]。

表 2 本研究所用到的引物

Table 2 Primers used in this study

Name	DNA Sequence (5'-3')	Restriction site
P1 F	CCGGAATTC**AAAGGAGGGAAATC**ATGAAAAACAAATTACCGCCATT	*EcoR* I
P1 R	CGAGCTCTTA**GTGGTGGTGGTGGTGGTG**ATGCCAGCAAAAATGGG	*Sac* I
P2 F	CCGGAATTC**AAAGGAGGGAAATC**ATGACCGCGACCCTTGAGCT	*EcoR* I
P2 R	CGAGCTCTTA**GTGGTGGTGGTGGTGGTG**CTCATTTTTTACTTTCG	*Sac* I
P3 F	CCGGAATTC**AAAGGAGGGAAATC**ATGCCGTTGCCGACGCTG	*EcoR* I
P3 R	CGAGCTCTTA**GTGGTGGTGGTGGTGGTG**GTGCAGGCAATAGTGCCG	*Sac* I
P4 F	CCGGAATTC**AAAGGAGGGAAATC**GTGAAGATGAAATTACCTC	*EcoR* I
P4 R	CGAGCTCTTA**GTGGTGGTGGTGGTGGTG**CTGCCGGCAAAAGTGAT	*Sac* I
P5 F	CGCGTCGAC**AAAGGAGGGAAATC**ATG**CACCACCACCACCACCAC**ATGGCAGAAAAAGGCATTAC	*Sal* I
P5 R	CGCGAATTCTTAAGAGCTGTACGCGGAGTTG	*EcoR* I

2. 结果及分析

2.1 不同来源 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶的克隆与表达

就如 1.4 所表述的，以不同来源的基因组 DNA 为模板，引物 P1 F/R, P2 F/R, P3 F/R, P4 F/R 进行 PCR 扩增，得到大小 1152 bp, 1152 bp, 1305 bp, 1152 bp 编码

383, 383, 434, 383 个氨基酸的基因片段，连接至 pMD18-T 载体测序，比对结果表明不同基因的同源性为 66.19%。将 T-*arg*E 用 *Eco*R I, *Sac* I 双酶切，回收 *arg*E 片段后，与线性化 pDXW10(+) 连接后转化，阳性转化子提取质粒经 *Eco*R I, *Sac* I 酶切验证，释放 8531 bp 和约 1152 bp, 1152 bp, 1305 bp, 1152 bp 大小的片段，分别对应 pDXW10(+) 和 *Kparg*E, *Ecarg*E, *Bsarg*E, *Smarg*E 的大小，结果表明质粒 pDXW10-*arg*E 构建成功，如图 2 所示。

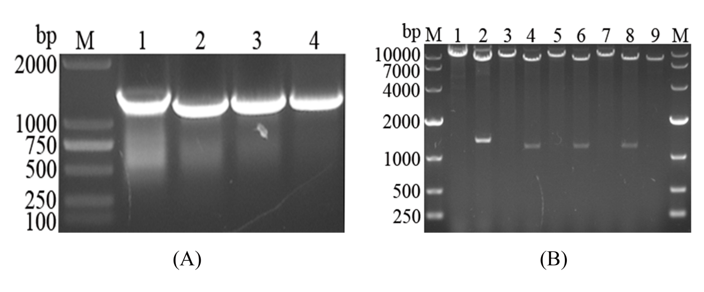


图 2 基因 PCR 结果及质粒 pDXW10-*arg*E 酶切验证

Fig 2 PCR results of *arg*E genes and identification of pDXW10-*arg*E plasmids and empty pDXW10 plasmid by single and double enzyme digestion;a: M: DL2000; Lane 1: *Bsarg*E; Lane : *Smarg*E; Lane 3: *Kparg*E; Lane 4: *Ecarg*E; **b:** M: DL10000 Maker; *Lane* 1,2; results of single and double enzyme digestion of pDXW10-*Bsarg*E; *Lane* 3,4: results of single and double enzyme digestion of pDXW10-*Smarg*E; *Lane* 5,6: results of single and double enzyme digestion of pDXW10-*Kparg*E; *Lane* 4: results of single and double enzymes digestion of pDXW10-*Ecarg*E; *Lane* 9: result of double enzyme digestion of empty pDXW10.

重组菌 pDXW10(+)-*argE*/BL21(DE3), 经诱导表达菌液经过超声破碎取上清 SDS-PAGE 分析，检测到分子量约为 39 KDa, 39 KDa, 47 KDa, 39 KDa 的特异性条带，如图 3 所示。将四种不同的上清液测得酶活为 156.8 U/g, 198.3 U/g, 30.2 U/g, 432.98 U/g，说明不同 *argE* 基因在大肠杆菌中表达，N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶具有生物学活性。采用 Ni-NTA 亲和层析，纯化后 NAOD 酶液比酶活为 416.26, 460.06, 62.03, 798.98 U/mg，结果见表 3。

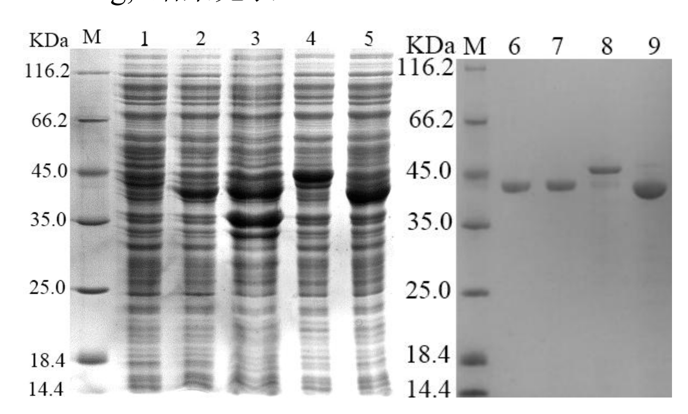


图 3 重组菌株粗蛋白及 NAOD 纯化后 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of crude proteins and NAOD purification. *M*: unstained protein Ladder; *Lane*1: crude enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pDXW10(+); *Lane* 2,6: crude enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pDXW10(+)-*Kparg*E, purified enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pDXW10(+)-*Kparg*E; *Lane* 3, 7: crude enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pDXW10(+)-*Ecarg*E, purified enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pDXW10(+)-*Kparg*E; *Lane* 4, 8: crude enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pDXW10(+)-*Bsarg*E, purified enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pDXW10(+)-*Bsarg*E; *Lane* 5,9: crude enzyme of *E. coli* BL21 with

plasmid pDXW10(+)-*SmargE*, purified enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pDXW10(+)-*SmargE*

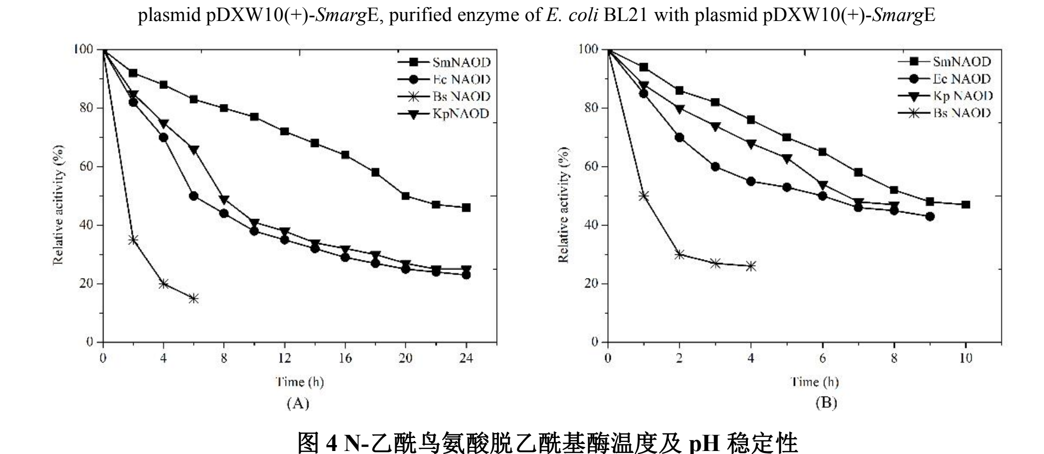


图 4 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶温度及 pH 稳定性

Fig. 4 Thermal and pH stability of N-acetyl-L-ornithine deacetylase. (a) under 30℃, Thermal stability of N-acetyl-L-ornithine deacetylase, **(b)** under pH 7, pH stability of N-acetyl-L-ornithine deacetylase

2.2 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶 (NAOD)的酶学性质的研究

由表 3 可知不同来源 (Sm、Kp、 Ec、 Bs) 的重组酶的最适反应 pH 分别为 7、7.5、7、8，但在 pH 6.0~9.0 范围内酶活均处于比较高的水平，从数据可以发现，在较酸性和强碱的条件下，比酶活的下降的比较快。由于钝齿棒杆菌发酵时的适宜 pH 控制在中性最为经济，所以对四个不同来源的酶分别 pH 7.0 处理 1-10 h 后测定酶活性，如图 4a 所示，酶在中性条件下，保温 1 h 后的酶活力来源 Bs 的已经丧失了 50%的酶活，而其它来源的均能保持 85%以上的酶活力，随着时间的变化，6 h 后来源 Ec 的酶丧失 50%，6.5 h 后来源 Kp 的酶下降 50%，而 Sm 也在 8.5 h 后酶活也只有初始的 50%。

如表 3 所示，在 25 ℃~70 ℃范围内进行酶促反应，来源于 Ec、Kp、Sm、Bs 最适反应温度为 40 ℃、40 ℃、40 ℃、50 ℃。为了经济效益，本研究对四个不同来源的 NAOD 酶进行在 37℃下测定酶的稳定性，由图 4b 可知，表明来源于 Kp, Sm 的 NAOD 酶热稳定相对较好，Kp, Sm, Ec 来源的 NAOD 酶在 37℃下 1 h 酶活还能保持 80%以上，随着放置的时间变化，最终 EcNAOD 的酶活在 6 h 后降低 50%，Kp 在 8.5 h 丧失 50%，而 SmNAOD 酶活在 20 h 下降一半，但是 Bs 来源的比较差，1 h 左右 BsNAOD 酶活几乎检测不到，说明酶已全部失活。

金属离子可以作为酶促反应过程中的辅助因子，在酶促反应中常常添加一些金属离子。在 NAOD 酶促反应添加金属离子以及 EDTA，以不加离子的反应液作为空白对照设其酶活为 100%，离子对不同来源的 NAOD 酶活的影响结果见表 3。Zn^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{+}离子对四种不同来源的 NAOD 酶都完全致死，EDTA, Fe^{3+}, Mn^{2+},

Li^{+}, Mg^{2+}, Co^{3+} 对Bs来源的NAOD酶的酶活都有不同程度的降低的影响。EDTA对四个来源的NAOD酶的酶活都有抑制，但是Bs, Kp来源的最为明显。Mn^{2+} 离子对KpNAOD酶的促进作用最大，其它的离子对KpNAOD都有抑制。Mn^{2+}, Li^{+}, Mg^{2+} 离子对SmNAOD酶活有促进作用，Mn^{2+} 离子使酶活提高50%左右。EcNAOD酶的酶活受 Mg^{2+}, Li^{+}也有轻微的促进作用。

表3 本实验所涉及的NAOD重组酶的酶学性质的研究

Table 3 Enzymatic properties of recombinant enzymes used in this study

Enzyme	organism	Specific activity[U/mg]	pH optimum	Temperature optimum (°C)	Metals
EcNAOD	*Escherichia coli* BL21(DE3)	416.26	7.0	37	Mg^{2+}, Li^{+} (0.1 mM a litter promote to activity)
SmNAOD*	*Serratia marcescens* Y213	798.98	7.0	37	Mn^{2+}, Li^{+}, Mg^{2+} (0.1 mM activity increases more than 50%)
KpNAOD	*Klebsiella pneumoniae* P01	460.06	7.5	37	Mn^{2+} (0.1 mM activity increases more than 50%)
BsNAOD	*Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain168G	62.03	8.0	50	Mn^{2+} (0.1 mM 57% inhibition)

“*” indicates that the corresponding parameters were used for next experiments.

2.3 重组菌SYPO/pDXW10-*Smarg*E及SYPO/pDXW10-*Ccarg*J的构建

利用上文构建的重组质粒pDXW10-*Smarg*E及pDXW10-*Ccarg*J，电击转化进SYPO-1，在含有卡那霉素的BHIS平板上筛选阳性转化子SYPO-2和SYPO-3。

2.4 重组钝齿棒杆菌SYPO-2/SYPO-3的获得及其与SYPO-1中N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶酶活比较

挑选SYPO-2, SYPO-3转化子和出发菌株SYPO-1接种于BHIS培养基16 h后转接于种子培养基16 h后离心收集菌体，经超声波破碎，通过SDS-PAGE胶验证，图5所示，NAOD蛋白在钝齿棒杆菌中的大小为39 KDa左右。而OATase蛋白在钝齿棒杆菌表达时，因OATase中存在ATML易断裂区，过量表达后表现为为26 KDa, 20 KDa的α和β两个亚基，这与文献中报道一致[23]，说明基因*arg*J表达。分别测定粗酶液中NAOD及OATase酶活，如表4所示。重组菌株SYPO-2粗酶液的N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶活力相对与出发菌株显著提高，并且OATase的酶活相对于野生型菌株提高了111.9%，证明了重组菌株SYPO-2的NAOD表达量加强，并且可以提高内源OATase的酶活。

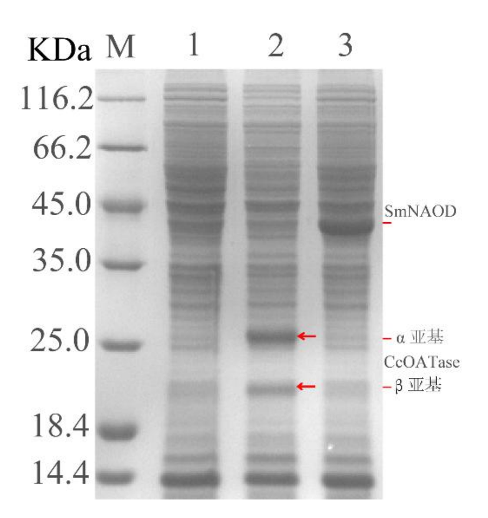


图 5 重组钝齿棒杆菌 NAOD 及 OATase 粗酶液 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the overexpression of SmNAOD and CcOATase in recombinant *Corynebacterium crenatum* SYPO-1. *M*: unstained protein ladder, *Lane* 1: SYPO-1/pDXW10(+), *Lane* 2: SYPO-1/pDXW10(+)-*Ccarg*J, *Lane* 3: SYPO-1/pDXW10(+)-*Smarg*E

表 4 重组钝齿棒杆菌粗酶液中的 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶与 N-乙酰鸟氨酸乙酰转移酶酶活比较

Table 4 Crude enzyme activities for NAOD and OATase in *C. crenatum*

Crude enzyme activity	Total activity of NAOD (U/mL)	Total activity of OATase (U/mL)
C. crenatum SYPO-1	0	5.9
SYPO-1/pDXW10-*arg*J	0	50.8
SYPO-1/pDXW10-*arg*E	128.4	12.5

2. 5 菌株发酵过程比较

研究表明 IPTG 的添加对细胞的生长具有一定的毒性，因此在以下重组菌的发酵中选择不添加 IPTG 改加少量乳糖诱导。分别对出发菌株 SYPO-1 及重组菌株 SYPO-2, SYPO-3 进行 250-mL 摇瓶发酵，通过对发酵过程中的重要参数的跟踪测定发现，摇瓶发酵到 96 h 鸟氨酸的产量分别为 8.2 g/L, 15.8 g/L, 12.3 g/L，可以发现重组菌株 SYPO-2 的产量较 SYPO-1, SYPO-3 的高 48.1%，22.2% 前期研究表明在发酵鸟氨酸的过程中，加入 0.05 g/L 的精氨酸对鸟氨酸的产量有一定的促进作用[12]。发酵 96 h 后细胞的干重没有明显的差异，发酵到后期，残糖无剩余。但是发酵过程中 SYPO-2 菌株的其它氨基酸如异亮氨酸，赖氨酸的产量较出发菌株有明显的降低。然而测定发酵过程中的乳酸和乙酸发现菌株的都比较高，这是由于摇瓶发酵过程中的氧气供应不足所致。

对菌株 SYPO-1、 SYPO-2 和 SYPO-3 进行 5-L 上罐发酵研究，并考察发酵过程中的参数的变化。每隔 8 h 取一次样测发酵液的 OD、残糖及产酸的情况。根据发酵的结果可以分析出重组菌株 SYPO-2 产酸能力较出发菌株 SYPO-1 及

SYPO-3 强。如图 6a 所示，发酵前期，重组菌株的 OD 不及出发菌株，但是稳定期后两者相差甚微；40 至 96 h 为菌体积累鸟氨酸的重要时期，此时重组菌株 SYPO-2 发酵产酸能力相对重组菌株 SYPO-3 及出发菌株 SYPO-1 来说优势较为明显，鸟氨酸的生成率明显提升。

发酵过程中的其它氨基酸及有机酸的对比，如表 5 可知，重组菌株发酵过程中，其它氨基酸如 L-缬氨酸，L-脯氨酸，L-异亮氨酸，L-赖氨酸相比出发菌株及重组菌株 SYPO-2 的结果都有明显下降，说明增加碳代流可以使提高目标物的产量，并且减少副产物的产生。5-L 发酵较摇瓶过程中，重组菌株 SYPO-2/3 及出发菌株有了较大的变化，乳酸、乙酸有明显的下降主要原因可能是菌株的 5-L 罐发酵过程中，有充足的氧气使得厌氧反应几乎停止。但是 SYPO-2 由于引入的线性化鸟氨酸途径中的 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰化酶去乙酰基反应的同时会产乙酸，使得发酵液中的乙酸的含量较 SYPO-1/3 中的要高。如图 6b，发酵到后期鸟氨酸的产量到达 38.5 g/L，相较出发菌株产酸 25.7 g/L 及重组菌株 SYPO-3 产 L-鸟氨酸 30.3 g/L, 提高了 33.2%，21.3%, 产率达 0.401 g/L/h。分析原因由于重组菌株 SYPO-3 中的 *arg*J 编码的 OATase 受产物 L-鸟氨酸的反馈抑制作用，因此酶活提高不明显，L-鸟氨酸合成代谢流得不到显著增强。从残糖曲线，而异源表达线性化途径中的 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶使得鸟氨酸的合成速率增加，其产量提高显著。可知重组菌 SYPO-2 在 16 h 开始葡萄糖的消耗量就比出发菌株 SYPO-1 及 SYPO-3 的要快，到 96 h 两者的残糖都为零。将上述重组菌株与已报道菌株产 L-鸟氨酸情况进行比较，如表 6 所示。

表 5 重组菌株与出发菌株的 5-L 发酵罐上的发酵液中的 18 种氨基酸的浓度

Table 5 concentration of 18 standard amino acid in the 5-L fermentation supernatants of the mutant strains

Amino acid /strains	SYPO-1 (g/L)	SYPO-1/*arg*J (g/L)	SYPO-1/*arg*E (g/L)
Asp	0.028±0.0002	0.026±0.0003	0.023±0.0002
Glu	0.15±0.001	0.14±0.009	0.16±0.009
Ser	0.004±0.0002	0.005±0.0003	0.004±0.0002
His	0.022±0.0003	0.023±0.0001	0.024±0.0002
Gly	0.058±0.0005	0.054±0.00021	0.059±0.00043
Thr	0.008±0.00006	0.005±0.00002	0.004±0.00003
Arg	0.005±0.0002	0.004±0.0001	0.004±0.0003
Ala	0.706±0.0043	0.659±0.0032	0.694±0.0045
Tyr	0.196±0.0012	0.210±0.0026	0.187±0.0015

Cys	0.008±0.0002	0.012±0.0003	0.009±0.0002
Val	**0.985±0.003**	**0.598±0.002**	**0.241±0.001**
Met	0.035±0.0001	0.034±0.0002	0.032±0.0001
Phe	0.042±0.0003	0.040±0.0002	0.032±0.0002
Ile	**3.528±0.032**	**3.112±0.027**	**2.432±0.018**
Leu	0.769±0.0065	0.654±0.0043	0.712±0.0059
Lys	**3.947±0.043**	**3.017±0.037**	**2.192±0.015**
Pro	**0.0007±0.00003**	**0.0004±0.00002**	**0.0002±0.00001**
Trp	0.008±0.0003	0.006±0.0005	0.005±0.0003

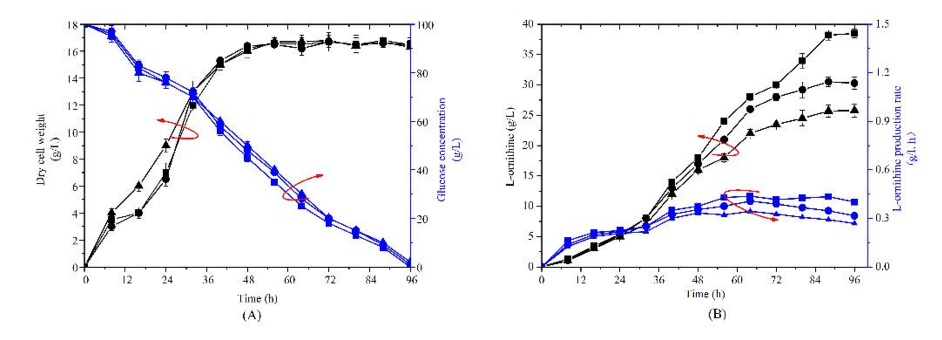


图 6 重组菌株 SYPO-2 与 SYPO-3 与出发菌株 SYPO-1 的发酵曲线

Fig. 6 Comparison of L-ornithine production between *C. crenatum* SYPO-1, recombinant SYPO-2 and SYPO-3. (a) Dry cell Weight and glucose concentration. (b) L-ornithine concentration and L-ornithine productivity. *C. crenatum* SYPO-1 (filled up triangles); recombinant SYPO-2 (filled squares) and recombinant SYPO-3 (filled circles) (all values the mean of at least three independent experiments, and error bars represent the standard deviations of the biological replicates)

表 6 比较不同菌株产 L-鸟氨酸的情况

Table 6 Comparison of various strains for the production of L-ornithine.

Strain	L-ornithine titer(g/L)	Cultivation method	Medium	Key engineering	Reference
C. crenatum SYPO-3	38.5	Bioreactor; batch	Semi-defined	•Deletion of *arg*F, *arg*R, and *pro*B •Heterologous expression of N-acetyl-L-ornithine deacetylase	This study
C. glutamicum YW06(pSY223)	51.5	Bioreactor; fed-batch	Semi-defined	•Deletion of *arg*F, *arg*R, and *pro*B •Reinforcement of the pp pathway flux •The use of a feedback-resistant enzyme	[8]
E. coli SJ7055	0.009	Shake flask; batch	Semi-defined	•Deletion of *arg*F, *arg*R,	

				argI, speF and *pro*B •The use of feedback-resistant *arg*G	[3]
C. glutamicum SJ8074 (pEK-CJBD)	0.179	Shake flask; batch	Semi-defined	•Deletion of *arg*F, *arg*R, and *pro*B	[7]
C. glutamicum △APE6937R42	24.1	Shake flask; batch	Semi-defined	•Deletion of *arg*F, *arg*R, and *pro*B •Adaptive evolution in presence of L-ornithine	[5]
Corynebacterium glutamicum S9114	18.4	Shake flask; batch	Semi-defined	•Inactivation of *arg*F, *ncgl*1221, *arg*R, and *put*P, attenuation of *odh*A •overexpression of *Lys*E	[9]

3. 讨论

课题组已对高产 L-精氨酸钝齿棒杆菌 SYPA5-5 进行了一系列系统代谢工程改造研究。如对精氨酸合成关键酶编码基因 *arg*B 进行定点改造，解除了其产物反馈抑制作用，并且在基因组上进行同源替换，显著提高了 L-精氨酸的产量和产率[14]。还发现了由 *Ccarg*J 基因编码的 N-乙酰鸟氨酸乙酰基转移酶受鸟氨酸的反馈抑制，在该酶的三维结构中发现其鸟氨酸的结合位点同时也是底物 N-乙酰鸟氨酸的结合位点，对该位点进行饱和突变后，分析结果可知，解除鸟氨酸反馈抑制作用的同时该酶的活性显著降低甚至失活。

本文首先对精氨酸线性合成途径中的 N-乙酰鸟氨酸转化成鸟氨酸的催化关键酶 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰化酶进行筛选，对其不同来源进行克隆及表达，并且对其酶学性质进行比较，研究表明 SmNAOD 酶的比酶活为 798.98 U/mg 为四种不同来源的最高，测定其最适 pH 为 7，在 pH 为 7 的条件下，测定其稳定性 SmNAOD 的酶活稳定性最好，8.5 h 后酶活下降到初始的 50%。SmNAOD 最适温度的为 40 ℃，在 37 ℃下测定 SmNAOD 酶的温度稳定性，Sm 的酶活稳定性最好。将最适来源的 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶及来源钝齿棒杆菌的鸟氨酸合成途径中的关键酶 N-乙酰鸟氨酸乙酰转移酶，在钝齿棒杆菌过量表达，结果显示由于 CcOATase 受到产物鸟氨酸的反馈抑制，N-乙酰鸟氨酸乙酰基转移酶 (CcOATase) 的过表达后的重组菌株 SYPO-3 中 L-鸟氨酸产量提高不明显；而

NAOD 由于不受鸟氨酸的反馈抑制作用，从而使得 N-乙酰鸟氨酸合成 L-鸟氨酸中的脱乙酰反应明显加快，使得产物鸟氨酸的积累增加。此外，还发现在 SYPO-1 菌株中过表达 SmNAOD 弥补了鸟氨酸合成途径中的关键酶 CcOATase 酶受产物鸟氨酸的反馈抑制作用， SmNAOD 酶在钝齿棒杆菌中的异源表达后，使得钝齿棒杆菌的 OATase 的酶活提高了 50% 以上，结果可知通过异源表达线性化途径中的 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶使得鸟氨酸的产量大幅提高。根据本研究可知，通过在钝齿棒杆菌中进行敲除代谢旁路来提高代谢通路中的碳代谢流，通过引入外源 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶使得代谢通路中的脱乙酰基反应加强，使得代谢途径中的终产物 L-鸟氨酸的过量积累。

4. 参考文献

[1] Han P S, Fishel R S, Efron D T, et al. Effect of Supplemental Ornithine on Wound Healing ☆ ☆☆. Journal of Surgical Research, 2002, 106(2): 299.

[2] 卢冬梅. 微生物合成鸟氨酸的代谢工程研究进展. 微生物学通报, 2015, 42(7): 1391-1399.
Lu D M. Progress in metabolic engineering for microbial synthesis of ornithine. Microbiology China, 2015, 42(7): 1391-1399.

[3] Lee Y J and Cho J Y. Genetic manipulation of a primary metabolic pathway for L-ornithine production in *Escherichia coli*. Biotechnol Lett, 2006, 28(22): 1849-56.

[4] Sakanyan V, Petrosyan P, Lecocq M, et al. Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: enzyme evolution in the early steps of the arginine pathway. Microbiology, 1996, 142 (Pt 1): 99-108.

[5] Jiang L Y, Chen S G, Zhang Y Y, et al. Metabolic evolution of *Corynebacterium glutamicum* for increased production of L-ornithine. BMC Biotechnology,13,1(2013-06-01), 2013, 13(1): 47-47.

[6] Dou W, Xu M, Cai D, et al. Improvement of L-arginine production by overexpression of a bifunctional ornithine acetyltransferase in *Corynebacterium crenatum*. Appl Biochem Biotechnol, 2011, 165(3-4): 845-55.

[7] Hwang J H, Hwang G H, and Cho J Y. Effect of increased glutamate availability on L-ornithine production in *Corynebacterium glutamicum*. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2008, 18(4): 704.

[8] Kim S Y, Lee J, and Lee S Y. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-ornithine. Biotechnol Bioeng, 2015, 112(2): 416-21.

[9] Zhang B, Yu M, Zhou Y, et al. Systematic pathway engineering of *Corynebacterium glutamicum* S9114 for L-ornithine production. Microb Cell Fact, 2017, 16(1): 158.

[10] Xu M, Rao Z, Dou W, et al. The role of ARGR repressor regulation on L-arginine production in *Corynebacterium crenatum*. Appl Biochem Biotechnol, 2013, 170(3): 587-97.

[11] Man Z, Xu M, Rao Z, et al. Systems pathway engineering of *Corynebacterium crenatum* for improved L-arginine production. Scientific Reports, 2016, 6: 28629.

[12] 赵芹芹, 罗玉常, 窦文芳, 等. 钝齿棒杆菌的代谢改造:L-鸟氨酸与 L-瓜氨酸合成菌株的构建. 微生物学通报, 2014, 41(10): 1941-1947.
Zhao Q Q, Luo Y C, Dou W F, et al., Engineering *Corynebacterium crenatum* for construction of L-Ornithine and L-Citrulline producers. Microbiology China, 2014, 41(10): 1941-1947.

[13] Xu M, Rao Z, Yang J, et al. Heterologous and homologous expression of the arginine biosynthetic *arg*C~H cluster from *Corynebacterium crenatum* for improvement of (L) -arginine production. J Ind Microbiol Biotechnol, 2012, 39(3): 495-502.

[14] Zhao Q, Luo Y, Dou W, et al. Controlling the transcription levels of argGH redistributed L-arginine metabolic flux in N-acetylglutamate kinase and ArgR-deregulated *Corynebacterium crenatum*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2016, 43(1): 55-66.

[15] 李子武, 张显, 徐美娟, 等. 一株产灵菌红素粘质沙雷氏菌的筛选、鉴定及发酵条件. 食品与生物技术学报, 2012, 31(10): 1018-1024.

Li Z W, Zhang X, Xu M J, et al. Screening and Identification a *Serratia marcescen* Strain Producing Red-Pigment and Preliminary Study of the Fermentation Conditions. Journal of Food Science and Biotechbology, 2012, 31(10): 1018-1024.

[16] 徐美娟, 杨套伟, 饶志明, 等. 克雷伯氏菌甘油脱氢酶 dhaD 的克隆表达、纯化及酶学性质研究. 中国生物工程杂志, 2008, 28(12): 30-35.

Xu M, Rao Z, Yang W, et al. Expression, Purification and Enzymatic Characterization of *Klebsiella sp*. Glycerol Dehydrogenase in *E. coli*. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 28(12): 30-35.

[17] Xu D, Tan Y, Shi F, et al. An improved shuttle vector constructed for metabolic engineering research in *Corynebacterium glutamicum*. Plasmid, 2010, 64(2): 85.

[18] 徐美娟, 张显, 饶志明, 等. 钝齿棒杆菌 N-乙酰鸟氨酸转氨酶的克隆表达分析及其重组菌的精氨酸发酵. 生物工程学报, 2011, 27(7): 1013-1023.

Xu M, Zhang X，Rao Z, et al, Expression, Cloning, expression and characterization of N-Acetylornithine aminotransferase from *Corynebacterium crenatum* and its effects on L-arginine fermentation. Chinese Journal of Biotechnology, 2011, 27(7): 1013-1023.

[19] Schã¤Gger H. Tricine-SDS-PAGE. Nature Protocols, 2006, 1(1): 16-22.

[20] Sambrook J, Fritsch E F, and Maniatis T. Molecular Cloning. A laboratory Manual. Analytical Biochemistry, 2001, 186(1): 182-183.

[21] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 1976, 72(s 1–2): 248–254.

[22] Javidmajd F and Blanchard J S. Mechanistic analysis of the argE-encoded N-acetylornithine deacetylase. Biochemistry, 2000, 39(6): 1285.

[23] Marc F, Weigel P, Legrain C, et al. An invariant threonine is involved in self-catalyzed cleavage of the precursor protein for ornithine acetyltransferase. J Biol Chem, 2001, 276(27): 25404-10.

[24] Tauch A, Kirchner O, Löffler B, et al. Efficient Electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a Mini-Replicon Derived from the *Corynebacterium glutamicum* Plasmid pGA1. Current Microbiology, 2002, 45(5): 362-7.

[25] Xu M, Rao Z, Dou W, et al. Site-directed mutagenesis and feedback-resistant N-acetyl-L-glutamate kinase (NAGK) increase *Corynebacterium crenatum* L-arginine production. Amino Acids, 2012, 43(1): 255-66.